

English Abstract for Japanese Patent Publication No. 1-124387:

S7 1 PN="JP 1124387"

?t s7/9/1

7/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007705883

WPI Acc No: 1988-339815/198848

XRAM Acc No: C88-150161

Non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein - obtd. by recombinant DNA techniques from liver infected with non-A non-B hepatitis

Patent Assignee: MITSUBISHI CHEM IND LTD (MITU)

Inventor: KAMIZONO M; KITAMURA N; MATSUI R; NAKAANISHI S; TERANISHI Y

Number of Countries: 004 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 293274	A	19881130	EP 88400790	A	19880331	198848 B
JP 64002576	A	19890106	JP 87140586	A	19870604	198907
JP 1124387	A	19890517	JP 87283990	A	19871110	198926
CN 1031717	A	19890315				199010
US 5032511	A	19910716	US 88168357	A	19880315	199131
EP 293274	B	19910904				199136
DE 3864585	G	19911010				199142
JP 2590885	B2	19970312	JP 87140586	A	19870604	199715

Priority Applications (No Type Date): JP 87283990 A 19871110; JP 8778313 A 19870331; JP 87140586 A 19870604

Cited Patents: 5.Jnl.Ref; EP 190972; EP 66296; EP 92249

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 293274	A	E	33		
JP 2590885	B2	13	C12N-015/09	Previous Publ. patent	JP 64002576

Abstract (Basic): EP 293274 A

A DNA fragment is claimed which contains a base sequence coding for a non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein occurring in cells of the liver affected with non-A non-B hepatitis. Also claimed is an expression vector in which a DNA fragment contg. a base sequence coding for non-A non-B hepatitis-specific antigen is introduced into a cloning site present downstream from a promoter and transformants obtd. using the vector.

USE/ADVANTAGE - The antigenic protein can be produced with low cost on a large scale. The protein can be used for the in vitro diagnosis of non-A non-B hepatitis. The DNA can also be used as a probe in hybridisation assays for detecting in vitro an infection by non-A non-B hepatitis virus.

0/7

Abstract (Equivalent): EP 293274 B

A DNA fragment which contains a base sequence coding for an antigenic protein specifically occurring in a host affected with non-A non-B hepatitis, said protein comprising the whole or a part of a sequence of 444 aminoacids given in the specification. (45pp)

Abstract (Equivalent): US 5032511 A

DNA fragment that encodes the prodn. of a non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein which occurs in liver cells infected with non-A non-B hepatitis, has been isolated. The aminoacid sequence of this antigenic protein has been determined. Expression vectors contg. this DNA fragment at a cloning site downstream from a promoter have been used to transform host cells to produce the antigenic protein. USE - The antigenic protein is a reagent for the rapid diagnosis of non-A non-B hepatitis and for the prodn. of vaccines.

(26pp)

Title Terms: NON; NON; HEPATO; SPECIFIC; ANTIGEN; PROTEIN; OBTAIN; RECOMBINATION; DNA; TECHNIQUE; LIVER; INFECT; NON; NON; HEPATO

Index Terms/Additional Words: DEOXYRIBONUCLEIC; ACID

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): A61K-039/29; C07H-015/12; C07K-003/00; C12N-001/20; C12N-005/00; C12N-007/00; C12N-015/00; C12P-019/34; C12P-021/02; C12R-001/19; C12N-015/09; C12R-001-91

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B02-V02; B04-B02B; B04-B04A; B12-A01; B12-G02; B12-K04A4; D05-H03B; D05-H04; D05-H06; D05-H07; D05-H12

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M421 M423 M720 M903 N135 Q233 V273 V752 V791

02 M423 M710 M903 Q233 V753

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 平1-124387

⑫ Int.Cl.

C 12 N 15/00
A 61 K 39/29
C 12 N 1/20

識別記号

厅内整理番号

A-8412-4B
7252-4C
G-8515-4B

⑬ 公開 平成1年(1989)5月17日

※審査請求 未請求 発明の数 3 (全26頁)

⑭ 発明の名称 非A非B型肝炎特異抗原をコードするDNAを有する発現ベクター
-、形質転換体および該抗原の产生方法

⑮ 特願 昭62-283990

⑯ 出願 昭62(1987)11月10日

⑰ 発明者 渋井 達郎 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内
⑱ 発明者 紅林 理恵 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内
⑲ 発明者 上園 みちる 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内
⑳ 出願人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
㉑ 代理人 弁理士 長谷川一 外1名

最終頁に続く

明細書

1 発明の名称

非A非B型肝炎特異抗原をコードするDNAを有する発現ベクター、形質転換体および該抗原の产生方法

2 特許請求の範囲

- (1) 非A非B型肝炎特異抗原をコードするDNAを含有するDNA断片を、プロモーターの下流に存在するクローニング部位に導入して成ることを特徴とする発現ベクター。
- (2) プロモーターが調節因子により制御可能なものであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の発現ベクター。
- (3) プロモーターが微生物で機能するプロモーターであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の発現ベクター。
- (4) プロモーターが真核生物で機能するプロモーターであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の発現ベクター。
- (5) 宿主を、非A非B型肝炎特異抗原をコード

するDNAを含有するDNA断片を、プロモーターの下流に存在するクローニング部位に導入して成る発現ベクターで形質転換して得られることを特徴とする形質転換体。

(6) 宿主が、大腸菌または枯草菌であることを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の形質転換体。

(7) 非A非B型肝炎特異抗原をコードするDNAを含有するDNA断片を、発現用ベクターのプロモーターの下流に存在するクローニング部位に導入し、ついで該DNA断片を導入した発現ベクターを宿主に導入して同宿主を培養し、該抗原を生成蓄積させ、これを取得することを特徴とする非A非B型肝炎特異抗原の产生方法。

3 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は、組換えDNA技術による宿主中の非A非B型肝炎発症時に特異的に見られる抗原をコードするDNAを含む発現ベクター、こ

れで形質転換された形質転換体及び該形質転換体を培養して非A非B型肝炎特異抗原を產生する方法に関する。

<従来の技術及び発明が解決しようとする問題点>

ウイルス性肝炎のうち、A型及びB型についてはそのウイルスが見出され、免疫学的な方法による診断も可能となっている。

しかしながら、A型でもB型でもない、所謂非A非B型といわれる肝炎は、輸血後肝炎の90%以上を占めるとされている〔日本臨床、35. 2724. (1977) ; J. Biol. Med. (ジャーナル オブ バイオロジカル メディシン), 49, 243. (1976) 〕が、未だ原因ウイルスが同定されておらず、ヒトの非A非B型肝炎がチンパンジーへ感染可能であることが確認されているにすぎない〔Lancet I (ランセット I), 459. (1978) ; 同, 463. (1978) 〕。

非A非B型肝炎に関連した抗原抗体系の検索は、多くの研究者によって患者の血清を中心になされているが、まだ明確な系は見出されてい

ない。そのため非A非B型肝炎の診断は、A型肝炎及びB型肝炎、更には肝障害をひきおこすことが知られている既知ウイルス、例えばCMV, HSV, EBV等による肝炎か否かの診断を行ない、これらに該当しない場合に非A非B型肝炎と診断する、所謂除外診断法によるため手間がかかるのが現状である。

特開昭61-176856号公報及び同61-56196号公報には、非A非B型肝炎の直接診断に有用な非A非B型抗原蛋白質をヒト及びチンパンジーの肝細胞から精製し、更にその治療に有用なモノクローナル抗体が提案されている。

しかしながら、例えば診断試薬として使用する場合には、多量の非A非B型肝炎特異抗原蛋白質を必要とするが、多量の該抗原蛋白質を非A非B型肝炎発症時のチンパンジー等の肝細胞から精製することは必ずしも好適な方法とはいえない。

<問題点を解決するための手段>

そこで本発明者らは、該抗原蛋白質を、遺伝

子工学的手法により大量に生産すべく鋭意検討を重ねた結果、かかる目的に有用な非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする遺伝子を初めて、分離取得し、該遺伝子を含んだ発現ベクターを得るに至り、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明の要旨は、非A非B型肝炎発症時に特異的に見られる抗原、又はそれと同様の生理活性を有する非A非B型肝炎特異抗原をコードするDNAを含有するDNA断片をプロモーターの下流に存在するクローニング部位に導入して成ることを特徴とする発現ベクター、該発現ベクターで形質転換して得られる形質転換体及び該形質転換体を培養して非A非B型肝炎特異抗原を產生する方法に存する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において用いるDNA断片の非A非B型肝炎発症時に特異的に見られる抗原をコードするDNAを含有するDNA断片は、以下のような方法によって調製される。

まず、ヒト又はチンパンジーの非A非B型肝

炎発症個体（本発明においては、近年命名された所謂D型肝炎発症個体を含む）の肝組織をグアニジウムチオシアネート水溶液等中でホモジナイズし、Chirgwinらの方法〔Biochemistry (バイオケミストリー) 18, 5294-5299. (1979)〕に従って、塩化セシウム平衡密度勾配超遠心法によって全RNAを沈殿として分離する。分離後、フェノール抽出、エタノール沈殿により全RNAを精製する。

抗原遺伝子のmRNAはpoly A部分を含むことが一般的であることから常法によりこれをオリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーにかけ精製し、ポリ(A)含有RNA(poly A+RNA)を単離し mRNA原料とする。このmRNA原料によりランダムプライマー法〔Yousuke Ebinaら、Cell (セル), 40, 747-758. (1980)〕によりこれらpoly A+RNAに対するcDNAライブライマーを得る。例えば、6塩基程度の任意のプライマーを用い逆転写酵素により上記mRNAに対するcDNAをランダムに合成

する。さらにこの cDNA を DNA メチラーゼ（例えば EcoRI メチラーゼ）によりメチル化し、cDNA 中に存在する該制限酵素切断部位を保護した後、両端に該制限酵素切断部位入り DNA リンカー（例えば EcoRI リンカー (CGAATTCC)）を付加し、該制限酵素（例えば EcoRI）により消化を行う。

このものをプラスミドあるいは λ ファージ等のクローニングベクターにクローニングする。例えば発現クローニングベクターである λgt 11 DNA [Young, R. A ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U.S.A.), 80, 1194-1198, (1983)] の EcoRI 部位に導入することができる。

かかる λgt 11 ファージ内に組み込まれた cDNA は λgt 11 ファージ上の β -gal 遺伝子の中に組み込まれるので該ファージの大腸菌への感染後 IPTG (インプロビル - β -D-ガラクトビラノシド) 等の物質添改による該ファージ

そのものから T. Maniatis らの方法 [Molecular Cloning (モレキュラー クローニング), Cold Spring Harbor] [Laboratory PP 65 (1982)] により DNA を精製し、適切な制限酵素例えば EcoRI 等で切断後、Maxam and Gilbert の方法 (Methods in Enzymology (メソッド イン エンザイモロジー), 65, 499-560, (1980)) によって又は制限酵素で切断後、更に M13 ファージにクローンし Sanger らのジオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U.S.A.), 74, 3463, (1977)) によって目的 cDNA セグメントの塩基配列が決定できる。

この様にして非 A 非 B 肝炎特異抗原をコードする cDNA 断片が得られる。しかしながら、このようにして得られる RNA 断片は、通常非 A 非 B 型肝炎特異抗原をコードする遺伝子の部分 cDNA 断片として得られる。完全長の cDNA は、上記と同様な方法で poly A⁺ mRNA を単離、

上のラクトースオペロンプロモーターの誘導により β-ガラクトシダーゼとの融合タンパク質等として容易に発現が確認される。

この様にして、cDNA が組み込まれた λgt 11 ファージを富沢らの方法（「バクテリオファージの実験法」99頁～174頁、岩波書店 1970 年 5 月 30 日発行）により大腸菌に感染させ、IPTG 等を含む培地で培養する。形成されたブラークを非 A 非 B 型肝炎特異モノクローナル抗体を使用し、免疫スクリーニング等の方法によって選択することにより容易に目的とする cDNA を得ることができる。

この免疫スクリーニング法に使用する抗体は特開昭 61-176856 号公報、或いは同 61-56196 号公報に記載されている方法に従い調製することができる。スクリーニング法もこれらに記載されているウエスタンプロットティング法で行えばよい。

更に上記免疫スクリーニング陽性のブラークから富沢らの方法によりファージを増殖させ、

精製し、このものから岡山 - Berg のベクター・プライマーの方法 (Molecular and Cellular Biology (モレキュラー アンド セルラー バイオロジー), 1, 161-170, (1982)) により cDNA ライブライアリーやを得る。この様にして調製した cDNA 含有プラスミドを常法、例えば D. Hanahan の方法 (J. Mol. Biol. (ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー), 166, 557, (1983)) により大腸菌等に形質転換し、アンビシリシン耐性株を取得する。この形質転換体を先の部分、DNA 断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法等によりスクリーニングする。

かかるプローブの作成法としては、ストレプトアビシン法、ホトビオテン核酸および ³²P 核酸を使用したニックトランスレーション法等が好ましい。

この様にして得られた cDNA クローンを含むコロニーを培養し Birnboim らの方法 (Nucleic Acid Res. (ニュークレイック ア

特開平1-124387(4)

シード リサーチ) . 2 , 1513 , (1979)] に従ってプラスミド DNA を得、適切な制限酵素で切断後、上記の Maxam and Gilbert の方法によって又は、制限酵素で切断後、更に M / N ファージもしくはプラスミド pVC12 ら等にクローゼンし、上述の Sanger らのジデオキシ法によって目的の完全長 cDNA セグメントの塩基配列の決定を行う。

図 1 に非 A 非 B 型肝炎特異抗原をコードする DNA の塩基配列を示した。

もとより、本発明に用いられる DNA 断片は必ずしもこれと同一の塩基配列を有することを要求されず、該 DNA 断片に含まれる DNA によってコードされる物質が、非 A 非 B 型肝炎特異抗原と同様の生理活性を有する物質をコードするものであれば、該塩基配列の一部が置換もしくは削除され、又は塩基が付加された塩基配列であってもよい。

本発明の発現ベクターは、上記のようにして得られた非 A 非 B 型肝炎特異抗原をコードする

リポゾーム結合配列としては、大腸菌、ファージ等由来のものでも良いが、合成により作成したコンセンサス配列、例えば、ACGAGGTAA
SD配列等の配列を持ったものが好ましい。非 A 非 B 型肝炎特異抗体遺伝子は、そのまま使用しても良いが、部位特異的変異 (バイオ テクノロジー (BIO TECHNOLOGY) July , 636-637 , (1984)) 等により余分な塩基配列 (non-coding 領域) を除いたものが好ましい。

転写終結因子は必ずしも必要ではないが、 ρ 非依存性のもの、例えば TSP ターミネーター、 trp オペロンターミネーター、リポソーム RNA 遺伝子のターミネーター等を有している方が好ましい。

また発現ベクターは、通常のプラスミドを使用しても良いが大腸菌または枯草菌で多コピー数になるプラスミド、例えば pBR J22 系 プラスミド、 pUB 110 系 プラスミド等を使用したものが好ましい。

さらに、これら発現に必要な因子の発現プラ

DNA を転写制御できる位置にプロモーターを含有する。

使用するプロモーターは、宿主中で発現可能ならば何でもよいが、更には制御可能なものが望ましい。

例えば大腸菌、枯草菌等の微生物を宿主とするときは、発現ベクターは、プロモーター、リポゾーム結合配列、非 A 非 B 型肝炎特異抗原遺伝子、転写終結因子、およびプロモーターを制御する遺伝子より成ることが好ましい。

プロモーターとしては、大腸菌、ファージ等由来のもの、例えば、トリプトファン合成酵素オペロン (trp) 、ラクトースオペロン (lac) 、リボプロテイン (rpp) 、 rec A 、ラムダファージ P_L , P_R 、 T5 初期遺伝子 P₂₈ , P₂₉ プロモーター等が挙げられる。これらは化学合成により作成されたものでもよい。また、 tac (trp : lac) 、 trc (trp : lac) 、 図 2 に示すような Pac (ファージ : 大腸菌) 等のハイブリッドプロモーターでもよい。

スミド上の配列順序は、 5'側上流から、プロモーター、 SD 配列、非 A 非 B 型肝炎特異抗原遺伝子、構造遺伝子、転写終結因子の順に並ぶことが望ましい。また転写の制御に必要なリブレッサー遺伝子、マーカー遺伝子 (薬剤耐性等) 及びプラスミド複製開始点等の順序はとくに限定はされない。

宿主の形質転換方法としては、大腸菌では Molecular Cloning (モレキュラー クローニング) . 25.0-253 , (1982) 記載の方法、また枯草菌では Molec. Gen. Genet. (モレキュラージェネラル ジェネティクス) . 168 , 115-115 , (1979) 及び Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U.S.A.) . 84 , 1072-1078 , (1987) 記載の方法等の常法を用いることができる。

形質転換体の培養方法としては、大腸菌、枯草菌とも通常の培養を行い得る培地 (Molecular Cloning (モレキュラー クローニング))

68-73, (1973) を用いることができる。また培養温度も 28~42°C で行えばよいが、好ましくは熱ショック蛋白質等の発現誘導の起らぬ範囲 (28~30°C) で行うのがよい。

宿主からの目的物の精製方法としては、常法に従い、例えば宿主細胞をリゾチーム-界面活性剤または超音波等により破碎した後、不溶性画分（非 A 非 B 型肝炎特異抗原は、この画分にある）を遠心分離により集め、これを界面活性剤（例えば 0.01% SDS 等）により可溶化した後、モノクローナル抗体（特開昭 61-56196 号公報及び同 61-176856 号公報）を用いたカラムクロマトグラフィーを通すことにより簡単に精製される。

また、真核細胞、例えば動物細胞においては次のようなものが好ましい。

プロモーターとしては、SV40 初期プロモーター、SV40 後期プロモーター、アボリボプロテイン E 遺伝子のプロモーター、アボリボプロテイン A-I 遺伝子のプロモーター、熱ショック

遺伝子のプロモーター（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 78, 7038-7042, (1981)）、メタロチオネイン遺伝子のプロモーター（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77, 6511-6515, (1980)）、HSVTK プロモーター、アデノウイルスのプロモーター（Ad 2 主要後期プロモーター (Ad 2MLP プロモーター)）、レトロウイルスの LTR (Long Terminal Repeat) 等が挙げられるが、SV40 プロモーター及びメタロチオネイン遺伝子のプロモーターが好ましい。

発現ベクターは 5'スプライス部位 (5' splice junction donor site)、イントロン及び 3'スプライス部位 (3' splice junction acceptor site) からなるスプライス配列 DNA (エキソン-イントロン接合部位、同接合部位周辺には共通の塩基配列が見出されており、イントロン領域が常に GT の 2 塩基 (ドナー部位) で始まり、そして AG の 2 塩基 (アクセプター部位) で終了

するといふいわゆる GT/AG 則が成立する。

このようなスプライス配列 DNA は、発現ベクター中に 1 以上存在してもよく、またその位置は、非 A 非 B 型肝炎特異抗原構造遺伝子の上流であっても、また下流であってもよい。

上記スプライス配列 DNA の具体例としては、ウサギ β-グロビン遺伝子のエクソン 2 及びエクソン 3 (Science (サイエンス), 26, 339, (1979) 参照)、メタロチオネイン遺伝子のプロモーター、エクソン 1, 2 及び 3 並びにイントロン A 及び B を含有するマウスマタロチオネイン-I 遺伝子 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 77, 6513, (1980) 参照) 中に存在するスプライス配列 DNA が挙げられる。また、5' 及び 3' スプライス部位は同一の遺伝子に由来する必要はなく、たとえば、アデノウイルス DNA 中に含まれる 5' スプライス部位と HSV 可変領域遺伝子に由来する 3' スプライス部位を連結した配列を使用できる。

本発明の発現ベクターは、さらにポリアデニル化部位を含有する。ポリアデニル化部位は、非 A 非 B 型肝炎特異抗原構造遺伝子の下流に存在する。ポリアデニル化部位の具体例としては、SV40 DNA、β-グロビン遺伝子又はメタロチオネイン遺伝子に由来するものが挙げられる。また、β-グロビン遺伝子のポリアデニル化部位及び SV40 DNA のポリアデニル化部位が連結したものであってもよい。

本発明の発現ベクターは、形質転換体の選択を可能とする優性な選択マーカーを有していてよい。発現ベクター中に選択マーカーがなくても、二重形質転換法 (cotransformation) により、形質転換された本発明の動物細胞を選択できる。このような選択マーカーとしては、MTX (メントレキセート) 耐性を与える DHFR 遺伝子、HAT 媒地中の形質転換 tk^r 株の選択を可能とするヘルベス・シンフレックスウイルス (HSV) の tk 遺伝子、ゾーデオキシストレプタミン抗生物質 ODN 对する耐性を付与する大

腸菌のトランスポゾン *Tn5* からのアミノグリコシドゴーホスフォトランスフェラーゼ遺伝子、重層増殖による形態的区別を可能にするウシバビローマウイルス遺伝子、*aprt* 遺伝子等が挙げられる。

また、二重形質転換法により、本発明の発現ベクターで形質転換した動物細胞を選択するには、上記した選択マーカとなる遺伝子を含有するプラスミドその他のDNAを発現ベクターと一緒に形質転換し、選択マーカの発現による上記した表現形質により、形質転換細胞を選択できる。

発現ベクターは、大腸菌等の細菌由来の複製起点を有するプラスミド断片を含有すると、細菌中でのクローニングが可能となり有利である。このようなプラスミドとしては pBRJ22, pBRJ27, pML 等が挙げられる。

発現ベクターに使用されるプラスミドベクターの具体例としては、SV40 初期プロモーター、ウサギの β -グロビン遺伝子に由来するスプラ

イス配列DNA、ウサギの β -グロビン遺伝子からのポリアデニル化部位、SV40 初期領域からのポリアデニル化部位並びに pBRJ22 からの複製起点及びアンピシリン耐性遺伝子を含有する pKCR (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブサイエンス U.S.A.), 78, 1528, (1981) 参照)、pKCR の pBRJ22 部分を pBRJ27 部分で置換し、ウサギ β -グロビン遺伝子のエクソン 3 中に存在する EcoR I 部位を Hind III 部位に変えた pKCR H2 (Nature (ネイチャー), 302, 605 参照)、BPV 遺伝子及びメタロチオネイン遺伝子を含有する pBPV MT1 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 398, (1983) 参照) 等が挙げられる。

発現ベクターで形質転換される動物細胞としては、CHO 細胞、COS 細胞、マウス L 細胞、マウス C127 細胞、マウス FM3A 細胞等が挙げられる。

本発明の発現ベクターの動物細胞への移入は

トランسفエクション法、マイクロインジェクション法等によることができる。トランسفエクション法としては、Ca-PO₄ (Virology (バイロロジー), 52, 456-467, (1973)) が最も一般的である。

移入により形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培地又は固着培地中で行なうことができる。

培地としては、MEM、RPMI/640 等が一般的である。

產生された蛋白の分離精製は、微生物により生産した場合と同様にしてできる。

(実施例)

以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り以下の実施例によって限定されるものではない。

参考例 / 非 A 非 B 型肝炎感染チンパンジー肝臓よりのポリ(A)RNA の調製
肝臓よりチオシアン酸グアニジン一塩化リテ

ウム法 (カサラ (Cathala) ら、DNA (ディーエス エー), 2, 329, (1983)) に従いポリ(A)を有する RNA を下記の如く調製した。

非 A 非 B 型肝炎に感染したチンパンジーより感染肝を摘出し、直ちに液体窒素にて凍結した。このものを液体窒素とともにワーリングブレンダーに入れ、3,000 r.p.m. 2 分間にて粉砕した。このものを 5 M チオシアン酸グアニジン、10 mM EDTA、50 mM トリス-HCl (pH 7) および 8% (v/v) β -メルカプトエタノールからなる溶液 10 ml 中でテフロンホモグナイザー (5 r.p.m.) にてさらに破碎し、可溶化した。この可溶化物 20 ml を遠心管に入っている 5.7 M CsCl 液液 10 ml 上に静かにのせ、Hitachi RPS 28-2 ローターにて 27,000 r.p.m.、20 時間遠心後 RNA を沈殿として回収した。この RNA の沈殿を 0.1 M ラクリル酸ナトリウム、1 mM EDTA、10 mM トリス-HCl (pH 7.5) からなる溶液 10 ml に溶解しフェノール-クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿により回収し

た。得られた RNA 約 3.95 μg を 10 mM トリス - HCl (pH 8.0) および 1 mM EDTA からなる溶液 1 mL に溶かした。65°C、5 分間インキュベートし 0.1 M の 5 M NaCl を加えた。混合物をオリゴ(dt)セルロース・カラム [ビー エル バイオケミカル (P-L Biochemical) 社製] クロマトグラフィー (カラム体積 0.5 mL) にかけた。吸着したポリ(A)を有する mRNA を 10 mM トリス - HCl (pH 7.5) および 1 mM EDTA からなる溶液で溶出し、ポリ(A)を有する mRNA 約 100 μg を得た。

まずポリ(A) mRNA 10 μg を RT 緩衝液 (20 mM トリス - HCl (pH 8.8) 、 0.1 M KCl 、 1 mM MgCl₂ 、 2 mM MnCl₂) 50 μL に溶かし、ランダムプライマー - d(N)₆ [ビー エル バイオケミカル (P-L Biochemical) 社製] 8 μg を加え、 95°C で 3 分間加熱して変性させた。これを室温まで徐冷し、ランダムプライマーをアニールさせた。このものに 10 mM dNTP 10 μL 、 逆転写酵素 225 u (宝酒造社製) を加え、水を

を得た。このものを上記したとおり、フェノール抽出し、除タンパクした後、エタノール沈殿を行って DNA を精製後、風乾した。

このものに 50 mM トリス - HCl (pH 7.5) 、 1 mM Na₂EDTA 、 5 mM DTT 20 μL 、 100 u MS - アデノシル - L - メチオニン 2 μL 、 1.8 mg / mL Eco RI メチラーーゼ 0.2 μL を加え、 37°C で 1.5 分間反応させ、 DNA 断片上の Eco RI 制限酵素切断部位のメチル化を行ない、その後 70°C で 1.5 分間熱処理を行って酵素を失活させた。

次に、ジリン酸化した Eco RI リンカー (CGAATTCC) を全合成 DNA 分子数の 100 倍になる様に加え、 10 倍濃度の T4DNA リガーゼ緩衝液 (0.5 M トリス - HCl (pH 7.5) 、 60 mM MgCl₂ 、 10 mM DTT) を 5 μL 加え、 0.1 M ATP 5 μL 、 T4DNA リガーゼ 5 u を加え計 50 μL の系とし、 4°C / 6 時間反応させた後、 70°C で 10 分間加熱して酵素を失活させた。次に 10 倍濃度の Eco RI 緩衝液 (15 M

加えて計 100 μL の系とし、 4°C で 1 時間反応させた。

上記反応液 50 μL を使用し、 0 mM NAD 2 μL 、 10 mM dNTP 10 μL 、 RNase H 5 u 、 大腸菌リガーゼ 1 u 、 大腸菌 DNA ポリメラーゼ I 6.3 u 、 10 倍濃度の T4DNA リガーゼ緩衝液 (0.1 M トリス - HCl (pH 7.5) 、 0.1 M DTT 、 60 mM MgCl₂) 10 μL を加え、 計 100 μL の系とし、 37°C で 1 時間反応させ、 2 本鎖 DNA を合成した。

上記の様にして得た 2 本鎖 DNA を同量の水飽和フェノールで抽出し、エーテルで水層のフェノールを除いた後、エタノール沈殿を行った。

得られた沈殿を 50 μL の水に溶かし、 10 倍濃度の T4DNA ポリメラーゼ緩衝液 (0.33 M トリス酢酸 (pH 7.9) 、 0.66 M 酢酸カリウム、 0.1 M 酢酸マグネシウム、 5 mM DTT) 10 μL 、 10 mM dNTP 10 μL 、 T4DNA ポリメラーゼ 6 u を加え、 100 μL の系とし、 37°C 1 時間反応させ、 2 本鎖の平滑末端をもった DNA

リス - HCl (pH 7.5) 、 0.5 M NaCl 、 60 mM MgCl₂) を 10 μL 、 Eco RI 100 u を加えて計 100 μL の系とし、 37°C で 2 時間反応させ、余分なリンカーを切除した。さらに Bio Gel A-50 (0.2 cm × 3.2 cm) (Bio RAD 社製) にこの反応液を通し、 10 mM トリス - HCl (pH 7.5) 、 6 mM MgCl₂ 緩衝液にて流出し、余分な Eco RI リンカーを除去し、 Eco RI リンカーの付いた二本鎖 cDNA を精製した。

得られた Eco RI リンカー付二本鎖 cDNA 断片を用い、 Eco RI で切断した λgt / / DNA 10 μg と 10 倍濃度の T4DNA リガーゼ緩衝液 (前述) 10 μL 、 0.1 M ATP 10 μL 、 T4DNA リガーゼ 10 u を加え計 100 μL の反応系で 4°C / 6 時間反応させ λgt / / DNA に上記二本鎖 cDNA 断片を挿入した。

1 ファージパッケージングキット (プロメガ Biotech 社製) を用い上記 DNA を 1 ファージ粒子中へ導入した。パッケージングの手順はキットの説明書に従い行った。

特開平1-124387(8)

このDNAパッケージングを終了した λ gt11ファージを常法（バクテリオファージ実験法99頁～174頁、岩波書店1970年5月30日発行）、富沢らの法により、大腸菌Y1090株に感染させブラークを形成させた。約20万個のブラークより以下に示すような免疫スクリーニング法により陽性のクローン1個を得た。この免疫スクリーニングに使用した抗体は特開昭61-176856号公報に記載されている方法で調製したものである。

まず λ gt11に感染したY1090[Young R.A. ら; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U.S.A.), 80, 1194-1198, (1983)]を37°Cに保温した上層吹寒天とともにシャレにまき、37°Cに5時間放置した。次に1.0 mM IPTGを含んだニトロセルロースフィルター(8&S社製BA-83ボアサイズ0.2μm)をその上に置き37°Cにて3～4時間培養した。このニトロセルロースフィルターをTBS緩衝

液(1.0 mMトリス-HCl(pH 7.5) 5.0 mM NaCl)で軽く洗い、1%ゼラチンを含むTBS緩衝液400μlに浸し、40°C、1時間振とうを行ってニトロセルロースフィルターのブロッキングを行った。次に非A非B型肝炎特異抗原に対するモノクローナル抗体($OD_{280} = 4.3$)を1%ゼラチンを含むTBS緩衝液に400分の1希釈になるように加え、フィルター1枚につき2mlになる様にビニール袋にフィルターとともにに入れ、室温で16時間反応させた。次に0.05% Tween 2.0を含むTBS緩衝液400μlにて10分間3回洗浄し、標識2次抗体である抗マウスIgG-PAP(フォースラディッシュペルオキシダーゼ)(Bio Rad社製)を1%ゼラチンを含むTBS緩衝液に1000分の1希釈に加え、フィルター1枚につき2mlになる様にビニール袋にフィルターとともにに入れ、室温で2時間反応させ、同様に0.05% Tween 2.0を含むTBS緩衝液400μlにて10分間3回洗浄した。発色はフィルターを4-Chloro-1-

naphthol(Bio Rad社製)1.2mgを過酸化水素水を含む20μlのTBS緩衝液に浸して行った。発色終了後、フィルターは水でよく洗い水を入れたビニール袋に入れて冷暗所に保存した。

このようにしてポジティブなブラークを1個得た。このポジティブブラークのシングルブラークアイソレーションを3度行った。3度とも免疫スクリーニングを同様に行いポジティブであることを確認した。

次にこのファージを大量に培養し、そのDNAを精製した。まずY1090菌をNZ培地(NZアミン1.0g、NaCl5g、5 mM MgCl₂を水1Lに加え、pH 7.2に調整)10mLで一晩培養した。このもの1mLにm.o.i.(マルチプリシティオブ インフェクション)0.1になる様にファージを感染させ、37°C 10分間放置後、NZ培地1Lに移し菌が溶離するまで7～8時間37°Cにて振とう培養を行い、クロロホルム5mLを加え、さらに30分間振とうを続けた。次に菌体残渣を6,500 r.p.m. 10分間の遠心分離

により除去し、上清にNaCl 2.0g、ポリエチレングリコール70gを加えよく溶かしてから4°Cで一晩放置した。6,500 r.p.m. 20分の遠心分離で沈殿を集め、よく水滴を切り沈殿を1.0mLのTM緩衝液(1.0 mMトリス-HCl(pH 7.5), 5 mM MgCl₂)に溶かし、DNase I、RNase Aをともに10 μg/mLの濃度になる様に加え、37°Cで1時間反応させた。

次に、2.0mLのクロロホルムを加えて攪拌し、ポリエチレングリコールをクロロホルムに溶解させて水面からとり除去した。この水面をさらに28,000 r.p.m. で60分の超遠心分離にかけ、ファージ粒子のペレットを得た。このペレットを1mLのTM緩衝液にとかし、CsCl密度勾配遠心(33,000 r.p.m. 20時間)により0-1.43-1.50のファージ粒子を含んだ分画を得た。TM緩衝液に対し一晩透析を行った後、プロティンアーゼKを100 μg/mLになる様加え、37°Cで1時間反応させた。その後、同量の水飽和フェノールを加えゆるやかにフェノ-

ル抽出を行った。6,500 r.p.m. 10分間の遠心分離の後、水層を取り出し、透析チューブに入れて水に対して4°Cで一晩透析を行った。との様にして、約5μgのDNAが得られた。

このDNA 100μgをEco RI 100Uで前述の緩衝液系100μL中にて37°C反応して切断したところ、390bpと345bpのcDNAセグメントがファージDNAに挿入されていることが判明した。この2つのEco RI フラグメントをクローニングベクターであるpUC 119のEco RI部位に再度クローニングし、ジデオキシ法にて市販のプライマー-CAGGAAACAGCTATGACおよびAOTCACGACGTTGTAを用いて夫々についてその塩基配列を決定した。2つのDNAの結合部分の塩基配列はこのcDNA断片の内部にあるBam HI、Eco RV部位を同部位に特異的な制限酵素で切断し、得られるBam HI-Eco RV DNAフラグメントをpUC 119のBam HI、Bma I部位に挿入して同様にジデオキシ法にてそのフラグメントの塩基配列を決定した。

沈殿によりDNAを回収した。Kpn Iで切断した該DNA約200μgを40mMカコジル酸ナトリウム、30mMトリス-HCl(pH 6.8)、1mM CaCl₂および0.1 mMジチオスレイトール(以下DTTと略記する)からなる緩衝液(以下TdT緩衝液と略記する)にdTTPを0.25mMとなるように加えた溶液200μLに加え、さらに8nLのターミナルデオキシヌクレオチジルトランスクレオチダーゼ(以下TdTと略記する)(P-L Biochemicals社製)を加えて、37°Cで11分間反応させた。ここでpCDV 1のKpn I切断部位の3末端ポリ(dT)鎖が約6.7倍付加された。該溶液からフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿によりポリ(dT)鎖の付加したpCDV 1 DNA約100μgを回収した。該DNAを10mMトリス-HCl(pH 7.5)、6mM MgCl₂および100mM NaClからなる緩衝液50μLに加え、さらに360UのHpa Iを加え、37°C 2時間反応させた。該反応物をアガロースグル電気泳動かけ、約3.1

該cDNA断片は、図-3に示す通りの塩基配列を有する。これは非A非B型肝炎等異抗原蛋白質をコードする遺伝子の部分cDNA断片であった。

参考例2 完全长の遺伝子を持ったcDNAの取得

参考例1記載のとおりにしてmRNAを調製し、岡山ベクターICより常法(Molecular cloning, PP 111, 1982)に従いcDNAを合成する。以下にcDNAの合成法を記す。

pCDV 1 [Okayama & Berg (オカヤマ アンド バーグ), Mol. Cell. Biol. (モレキュラー アンド セルラー バイオロジー), 3, 280, (1983)] 400μgを10mMトリス-HCl(pH 7.5)、6mM MgCl₂および10mM NaClからなる溶液300μLに加え、さらに500UのKpn I(宝酒造社製、以下特記しない限り制限酵素はすべて宝酒造社製)を加えて、37°Cで6時間反応させ、プラスミド中のKpn I部位で切断した。フェノール-クロロホルム抽出後、エタノール

KpのDNA断片を分離、回収し、約60μgのポリ(dT)鎖付加pCDV 1を得た。該DNAを10mMトリス-HCl(pH 8.0)および1mM EDTAからなる溶液500μLに溶解し、65°C 5分間インキュベート後、氷冷して50μLの5M NaClを加えた。混合物をオリゴ(dA)セルロースカラム(コラボラティブリサーチ社製)クロマトグラフィーにかけた。ポリ(dT)鎖長が充分なものはカラムに吸着し、これを10mMトリス-HCl(pH 8.0)および1mM EDTAからなる溶液で溶出し、ポリ(dT)鎖の付加したpCDV 1(以下ベクタープライマーと略記する)27μgを得た。

次にリンカーDNAの調製を行った。PL 1 [Okayama & Berg (オカヤマ アンド バーグ), Mol. Cell. Biol. (モレキュラー アンド セルラー バイオロジー), 3, 280, (1983)] 約1.4μgを10mMトリス-HCl(pH 7.5)、6mM MgCl₂および50mM NaClからなる溶液200μLを加えさらに50UのPst Iを加え、

特開平1-124387 (10)

37°Cで4時間反応させ、pL / DNA中のPstI部位で切断した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行い、PstIで切断したpL / DNA約1.3μgを回収した。該DNA約1.3μgをTdT緩衝液には終濃度0.15mMのdGTPを含む溶液50μlに加え、さらにTdT(P-L Biochemicals社製)54単位を加えて37°Cで13分間インキュベートし、pL / のPstI切断部位3'末端に(dG)鎖を約14個付加した。フェノール-クロロホルム抽出後エタノール沈殿にてDNAを回収した。該DNAを1.0 mMトリス-HCl(pH 7.5)、6 mM MgCl₂および6.0 mM NaClからなる緩衝液1.00 μlに加え、さらに50 uのHind IIIを加えて37°C 3時間インキュベートし、pL / DNAのHind III部位で切断した。該反応物をアガロースグル電気泳動にて分画し、約0.5 kbのDNA断片をDEAEペーパー法(Dretzen et al(ドレツエンら), Anal. Biochem. (アナリティカルバイオケミストリー)。

11月29日(1981)にて回収し、オリゴ(dG)鎖付きのリンカ-DNA(以下単にリンカ-DNAと略記する)を得た。

上記で調製したポリ(A)RNA約2μg、ベクター-プライマー約1.4 μgを5.0 mMトリス-HCl(pH 8.3)、5 mM MgCl₂、3.0 mM KCl、0.3 mM DTT、2 mM dNTP(dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP)および10uのリボヌクレアーゼインヒビター(P-L Biochemicals社製)からなる溶液2.3μlに溶かし、10uの逆転写酵素(生化学工業社製)を加え、37°Cで40分間インキュベートし、mRNAに相補的なDNAを合成させた。該DNAをフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行いRNA-DNA二重鎖の付加したベクター-プライマー-DNAを回収した。該DNAを6.0 μM dCTPおよび0.2 μg ポリ(A)を含むTdT緩衝液2.0 μlに溶かし、14uのTdT(P-L Biochemical社製)を加えて37°Cで3時間インキュベートし、cDNA 3'末端に12個の(dC)

鎖を付加した。該反応物をフェノール-クロロホルムを抽出し、エタノール沈殿により(dG)鎖の付加したcDNA-ベクター-プライマー-DNAを回収した。該DNAを1.0 mMトリス-HCl(pH 7.5)、6 mM MgCl₂および6.0 mM NaClからなる液4.00 μlに溶かし、50 uのHind IIIを加え、37°C 3時間インキュベートし、Hind III部位で切断した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿して0.5 pmoleの(dG)鎖付加cDNA-ベクター-プライマー-DNAを得た。該DNA 0.05 pmoleと前記のリンカ-DNA 0.16 pmoleを1.0 mMトリス-HCl(pH 7.5)、0.1 M NaClおよび1 mM EDTAからなる4.00 μlに溶かし、65°C、45°C、0°Cでそれぞれ10分、25分、30分間インキュベートした。2.0 mMトリス-HCl(pH 7.5)、4 mM MgCl₂、1.0 mM (NH₄)₂SO₄、0.1 M KClおよび0.1 mM β-NADの組成で重量4.00 μlとなるよう反応液を調製した。該反応液に1.0 uの大腸菌DNAリガーゼ(New

England Biolabs社製)を加え、11°C一夜インキュベートした。該反応液を各4.0 μMのdNTP、0.15 mM β-NADとなるよう同成分を追加調製し、5 uの大腸菌DNAリガーゼ、7 uの大腸菌DNAポリメラーゼI(P-L Biochemicals社製)および2 uの大腸菌リボヌクレアーゼH(P-L Biochemicals社製)を加え、12°C、25°Cで順次1時間ずつインキュベートした。

上記反応でcDNAを含む組換えDNAの環状化とRNA-DNA二重鎖のRNA部分がDNAに置換され、完全な二重鎖DNAの組換えプラスミドが生成した。

このものを使用し、常法により作成した大腸菌MC1064株のコンピテント細胞を形質転換した。形質転換体約5万個をニトロセルロース上に固定した。これらのコロニーをコロニーハイブリダイゼーション法(Molecular Cloning Cold Spring Harbor Laboratory PP 339(1982))により、常法に従い参考例1で得

たcDNA断片を³²P標識してプローブとして用い、スクリーニングした結果、約20個で強く会合した3個の陽性なクローンが得られた。

これらのクローンをサザン(Southern)の方法(J. Mol. Biol. (ジャーナル オブ モレキュラーバイオロジー), 98, 503, (1975))により詳しく解析した結果、図4に示す非A非B型肝炎特異抗原蛋白質コードする遺伝子の完全長のcDNAが得られた。この完全長cDNAを含む発現ベクターをpCDVCL-1と命名した。

(実施例1)

A. 発現ベクター及び形質転換体の作成

1) N末端の変異

① pCDVCL-1 5 μgを10 mMトリス-HCl(pH 7.5), 100 mM NaCl及び6 mM MgCl₂からなる緩衝液(以下、「緩衝液H」と略記)100 μL中で、Pvu I 10 uと37°Cで2時間反応させて消化し、75°Cで15分間加熱し、酵素を失活させた後、水に対して、透析して乾燥させた。このも

のに3.3 mMトリス-酢酸(pH 7.9), 6.6 mM酢酸カリウム、10 mM酢酸マグネシウム及び0.5 mMジチオスレイトールからなる緩衝液に2 mM 4-デオキシトリリノ酸を加え、40 μLの系とし、T4 DNAポリメラーゼ4 uにより3'突出末端を平滑化し、70°Cにて10分間加熱し、酵素を失活させた後、水に対して透析し、乾燥させた後、50 μLの水溶液として保存した。……フラグメントI

②一方、pCDVCL-1 20 μgを緩衝液H/100 μL中でNco I, Hind III 各20 uにて37°Cで2時間反応させ消化した。このものを5%アクリルアミドゲル電気泳動(89 mMトリス, 8.9 mMホウ酸及び2 mM EDTAからなる緩衝液/0.1 V/cm, 1.5時間泳動)にてDNAを分離し、ゲルを0.05%エチジウムプロマイド水溶液で染色後、340 nmの紫外線の下で分子量の大きい方の2本のフラグメントを切り出し、ゲルをガラス棒

にて破碎した後、DNA抽出緩衝液(0.5 M酢酸アンモニウム、10 mM酢酸マグネシウム、1 mM EDTA 及び0.1%アクリル硫酸ナトリウム)4 mL中に懸濁し、37°Cで1晩放置してゲルよりDNAを抽出した。大きなゲル片を10,000 r.p.m./15分間の遠心で除いた後、グラスフィルターによりさらに小さなゲル片を除き、エタノール沈殿を3回行って、DNAを精製し、200 μLの水溶液として保存した。……フラグメントII

③ 変異をさせたい下記の部分のプライマーを、DNA合成機(日科学社製、Applied Biosystem MODEL 380A)にて合成した。合成したDNAは濃アンモニア水と55°Cで一晩反応させ、保護基をはずした後逆相HPLCにより精製して使用した。

Hind III

プライマー	ACAACAGATCTAAAGCTTA
[元の配列]	[-----A---A-G--]

TGGCAAGTTACAACAAAGAT
-----G-----TC-C-

TAACATGGTTGCATG
-----G-----]
5'ベース(×:変位した部分)

上記プライマー/50 pmolをキナーゼ緩衝液(50 mMトリス-HCl(pH 8.0), 10 mM MgCl₂及び5 mMジチオスレイトール)10 μLの系で20 uのT4ポリヌクレオチドキナーゼにより3'をリン酸化した。

④ ヘテロデュープレックスの形成

フラグメントI 0.05 pmole, フラグメントII 0.05 pmole及び5'-リン酸化プライマー/5 pmoleにて5倍濃度のポリメラーゼリガーゼ緩衝液(0.5 mM NaCl, 1.25 mMトリス-HCl(pH 7.5), 40 mM MgCl₂及び5 mM β-メルカプトエタノール)を12 μL加え、計34.8 μLの系とし、100°Cで3分間煮沸し、直ちに30°Cの恒温槽に入れ、30分間放置した。次に、4°Cにて

30分放置し、更に氷上に10分間放置してヘテロデュープレックスを形成させた。

このヘテロデュープレックスを含む水溶液 $1.6 \mu\text{L}$ に $2.5 \mu\text{M}$ d-デオキシヌクレオチドトリリン酸を $2 \mu\text{L}$ 、 10mM ATPを $2 \mu\text{L}$ 加え、さらに $2 \mu\text{L}$ のKlenow酵素、 $0.5 \mu\text{L}$ のT4DNAリガーゼを加え、計 $30 \mu\text{L}$ の系にて、 37°C で一晩反応させ、DNAを環状化させた。

この環状DNAを含む水溶液 $2 \mu\text{L}$ を用い、常法に従い大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換体を得た。この形質転換体からプラスミドを常法に従い分離・精製し、制限酵素Hind IIIにより切断し、5%アクリルアミドゲル電気泳動により2つのフラグメントに分れたプラスミドを変異プラスミドとして得た。この場合得られる変異プラスミドには、往々にしてもとのプラスミド(野性型)が混入しているので、この変異プラスミドを用い再度大腸菌HB101株を形質

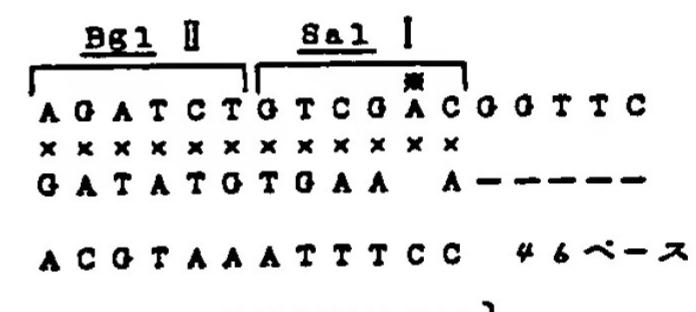
転換し、変異プラスミドを純化した。

この様にして、プラスミドpCV44Hを得た(図-5)。

3) C末端の改変

- ① pCDVCL-1 $5 \mu\text{g}$ を、前記1)の①と同様に処理してフラグメントIを得た。
- ② pCDVCL-1 $20 \mu\text{g}$ を NcoI, NsiI 各 $5 \mu\text{L}$ を用いる以外は前記1)の②と同様にしてフラグメントIIを得た。
- ③ 前記1)の③と同様にして下記プライマーを合成し、その5'をリン酸化した。

プライマー OCACAAAGGAAAAAAATG
〔元の配列〕 [-----A



(x: 変異した部分, ●: 追加部分)

④ ヘテロデュープレックスの形成

前記1)の④において、上記2)の①~③で得たフラグメントI, II及びゲーリン酸化プライマーを使用する以外は同様にしてプラスミドpCV44Bを得た(図-6)。

3) 特異抗原cDNAの発現ベクターへの導入

- ① pCV44H $1.0 \mu\text{g}$ (~3 pmol)を、緩衝液H $100 \mu\text{L}$ 中で、Hind III $20 \mu\text{L}$, Bgl II $20 \mu\text{L}$ を用い、 37°C にて2時間反応させ、切断した。このものを5%アクリルアミドゲル電気泳動にかけ、467 bpの特異抗原のN末端をコードするDNA断片を分離、精製した。……フラグメントN
- ② pCV44B $1.0 \mu\text{g}$ (~3 pmol)を、緩衝液H $100 \mu\text{L}$ 中で、Bgl II $20 \mu\text{L}$, Sac I $20 \mu\text{L}$ を用い、 37°C にて2時間反応させ、切断した。このものを5%アクリルアミドゲル電気泳動にかけ、836 bpの特異抗原のC末端をコードするDNA断片を分離、精製した。……フラグメントC

- ③ 発現ベクターであるpUS△H $2 \mu\text{g}$ (~1 pmol)を緩衝液H中にてHind III $2 \mu\text{L}$, Bgl II $2 \mu\text{L}$ を用い、 $20 \mu\text{L}$ の系で $37^\circ\text{C} 2 \text{ hr}$ 反応させ切断した。このものを、同容の水飽和フェノールにより抽出して除蛋白し、エーテルにてフェノールを抽出した後、水に対して透析を行い、脱塩し、バキュームポンプにより濃縮して、発現ベクター断片HBを含む $10 \mu\text{L}$ の水溶液を得た。

- ④ フラグメントN 0.5 pmol , フラグメントC 0.5 pmol と発現ベクター断片HB 0.1 pmol とを混合し、 10 mM トリス-HCl(pH 7.5), 1 mM ジテオスレイトール, 6 mM MgCl₂及び 1 mM ATPからなる緩衝液 $10 \mu\text{L}$ 中にてT4DNAリガーゼ $1 \mu\text{L}$ を加え、 37°C で1時間反応させた。このものを $2 \mu\text{L}$ 使用し、市販の大腸菌JM109コンビテントセルを常法に従い、形質転換した。形質転換体はアシビシリソウを $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含むL培地(バクトペプトン 10 g/L 、イースト

トエキストラクト 5 g/L、NaCl 10 g/L、寒天 5 g/L)にて選択し、特異抗原遺伝子の挿入されている発現ベクター-pCZ44を得た(図-?)。

B. 特異抗原の発現

pCZ44を保持している大腸菌JM109株をレブロスにて、30℃一晩培養した。このものを50倍希釈となるように新しいレブロス培地に植菌し、2時間、30℃で振とう培養した。次に、IPTG(イソプロビル-β-D-ガラクトビラノシド)を2 mMになるよう培地に加え、さらに2時間30℃にて振とう培養を行った後に、6,500 r.p.mで10分間の遠心分離により集菌した。このものを0.9% NaCl及び10 mMトリス-HCl(pH 7.5)の緩衝液に懸濁し、保存した。

C. 特異抗原の発現の確認

上記Bで得られた菌体0.3 ml培養分を、10% SDS-PAGEポリアクリルアミドゲル電気泳動(トリス3.8/L、グリシン/4.4 g/L及び

体である抗マウス IgG-PAP(フォースラディッシュベルオキシダーゼ)(Bio Rad社製)を1%セラチンを含むTBS緩衝液に1000倍希釈となるように加え、フィルター/枚につき2 mlになる様にビニール袋にフィルターとともにに入れ、室温で2時間反応させ、同様に0.05% Tween 20を含むTBS緩衝液400 mlにて10分間3回洗浄した。発色はフィルターを4-Chloro-1-naphthol(Bio Rad社製)1.2 mlを過酸化水素水を含む2.0 mlのTBS緩衝液に浸して行った。発色終了後、フィルターは水でよく洗い水を入れたビニール袋に入れて冷暗所に保存した。

この様にして、非A非B型肝炎特異抗原の発現の有無を調べたところ、感染ナンバンジー肝臓由来の特異抗原と同じ位置(**Ka)に反応する蛋白質が検出され、大腸菌にて該特異抗原の発現が確認された。

(発明の効果)

非A非B型肝炎特異抗原蛋白質を直接診断試

0.1% SDSからなる緩衝液、120V、1時間)にかけた後、ゲルを取り出してニトロセルロースフィルター上に直層し、ろ紙にはさみ、トリス3.8/L、グリシン/4.4 g/Lの緩衝液中で5 V/cm、4°Cにて泳動し、ゲル中の蛋白質をニトロセルロースフィルター上にブロッティングした。このニトロセルロースフィルターをTBS緩衝液(10 mMトリス-HCl(pH 7.5)及び50 mM NaCl)で軽く洗い、1%セラチンを含むTBS緩衝液400 mlに浸し、40℃、1時間振とうを行ってニトロセルロースフィルターのブロッキングを行った。次に非A非B型肝炎特異抗原に対するモノクローナル抗体(OD₄₅₀ = 4.3)を1%セラチンを含むTBS緩衝液に400分の1希釈になるように加え、フィルター/枚につき2 mlになる様にビニール袋にフィルターとともに入れ、室温で16時間反応させた。次に0.05% Tween 20を含むTBS緩衝液400 mlにて10分間3回洗浄し標識2次抗

素として使用する場合には、多量の非A非B型肝炎特異抗原蛋白質を必要とするが、多量の非A非B型肝炎特異抗原蛋白質を非A非B型肝炎発症時のナンバンジー等の肝細胞から精製することは、困難なことである。本発明によりナンバンジー等の感染肝細胞を使用することなく、しかも安価に安全に大量の該抗原蛋白を精製することが出来る。

* 図面の簡単な説明

図-1は、非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする塩基配列を表わす図である。

図中、「-」はその上に示された塩基に相補的な塩基を表わす。

図-2は、ハイブリドプロモーターPacの塩基配列を表わす図である。

図-3は、参考例1で得たcDNAの塩基配列を表わす図である。

図-4は、参考例2で得たcDNAの塩基配列を表わす図である。

図中、第5?番から第138番までが非A非

B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする塩基部分
を表わす。

図-5は、プラスミドpCV***Hを作成するた
めの概略図を表わす。

図-6は、プラスミドpCV***Bを作成するた
めの概略図を表わす。

図-7は、プラスミドpCZ***を作成するた
めの概略図を表わす。

出願人 三菱化成工業株式会社

代理人 弁理士 長谷川 一

ほか／名

図-1(その1)

5' ATG GCA GTG ¹⁰ ACA ACT CGT ²⁰ TTG ACA TGG ³⁰ TTG
3' --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

CAT GAA AAG ⁴⁰ ATC CTG CAA ⁵⁰ AAT CAT TTT ⁶⁰ GGA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GGG AAG CGG ⁷⁰ CTT AGC CTT ⁸⁰ CTC TAT AAG ⁹⁰ GGT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

AGT GTC CAT GGA ¹⁰⁰ TTC CAT AAT GGA GTT ¹¹⁰ TTG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

CTT GAC AGA TGT ¹³⁰ TGT AAT CAA ¹⁴⁰ GGG CCT ¹⁵⁰ ACT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

CTA ACA GTG ATT TAT ¹⁶⁰ AGT GAA GAT CAT ATT ¹⁷⁰ ATT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

ATT GGA GCA TAT GCA ¹⁹⁰ GAA GAG ²⁰⁰ GGT TAC CAG ²¹⁰
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

図 - 1 (その2)

GAA AGA AAG ²²⁰ TAT GCT TCC ²³⁰ ATC ATC CTT ²⁴⁰
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

 GCA CTT CAA ²⁵⁰ GAG ACT AAA ²⁶⁰ ATT TCA GAA ²⁷⁰
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

 AAA CTA GGA ²⁸⁰ CTA TAT ACA ²⁹⁰ CCA GAA ACA ³⁰⁰
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

 TTT TGT TGT ³¹⁰ GAC GTT GCA ³²⁰ AAA TAT AAC ³³⁰ TCC
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

 CCA ACT AAT ³⁴⁰ TTC CAG ATA GAT ³⁵⁰ GGA AGA ³⁶⁰ AAT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

 AGA AAA GTG ³⁷⁰ ATT ATG GAC ³⁸⁰ TTA AAG ACA ³⁹⁰ ATG
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

 GAA AAT CTT ⁴⁰⁰ GGA CTT GCT ⁴¹⁰ CAA AAT TGT ⁴²⁰ ACT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

 ATC TCT ATT CAG ⁴³⁰ GAT TAT GAA ⁴⁴⁰ GTT TTT ⁴⁵⁰ CGA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

 TGC GAA GAT ⁴⁶⁰ TCA CTG GAC ⁴⁷⁰ GAA AGA ⁴⁸⁰ AAG ATA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

 AAA GGG GTC ATT ⁴⁹⁰ GAG CTC ⁵⁰⁰ AGG AAG AGC ⁵¹⁰ TTA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

図-1(図3)

520 530 540
CTG TCT GCC TTG AGA ACT TAT GAA CCA TAT
--- --- --- --- --- --- --- --- ---
550 560 570
GGA TCC CTG GTT CAA CAA ATA CGA ATT CTG
--- --- --- --- --- --- --- ---
580 590 600
CTG CTG GGT CCA ATT GGA GCT GGG AAG TCT
--- --- --- --- --- --- --- ---
610 620 630
AGC TTT TTC AAC TCA GTG AGG TCT GTT TTC
--- --- --- --- --- --- --- ---
640 650 660
CAA GGG CAT GTA ACG CAT CAG GCT TTG GTG
--- --- --- --- --- --- --- ---
670 680 690
GGC ACT AAT ACA ACT GGG ATA TCT GAG AAG
--- --- --- --- --- --- --- ---
700 710 720
TAT AGG ACA TAC TCT ATT AGA GAC GGG AAA
--- --- --- --- --- --- --- ---
730 740 750
GAT GGC AAA TAC CTG CCA TTT ATT CTG TGT
--- --- --- --- --- --- --- ---
760 770 780
GAC TCA CTG GGG CTG AGT GAG AAA GAA GGC
--- --- --- --- --- --- --- ---
790 800 810
GGC CTG TGC ATG GAT GAC ATA TCC TAC ATC
--- --- --- --- --- --- --- ---

图 -1 (#74)

820 830 840
 TTG AAC GGT AAC ATT CGT GAT AGA TAC CAG

850 860 870
 TTT AAT CCC ATG GAA TCA ATC AAA TTA AAT

880 890 900
 CAT CAT GAC TAC ATT GAT TCC CCA TCG CTG

910 920 930
 AAG GAC AGA ATT CAT TGT GTG GCA TTT GTA

940 950 960
 TTT GAT GCC AGC TCT ATT GAA TAC TTC TCC

970 980 990
 TCT CAG ATG ATA GTA AAG ATC AAA AGA ATT

1000 1010 1020
 CGA AGG GAG TTG GTA AAC GCT GGT GTG GTA

1030 1040 1050
 CAT GTG GCT TTG CTC ACT CAT GTG GAT AGC

1060 1070 1080
 ATG GAT CTG ATT ACA AAA GGT GAC CTT ATA

1090 1100 1110
 GAA ATA GAG AGA TGT GTG CCT GTG AGG TCC

图 -1 (#75)

1120 1130 1140
 AAG CTA GAG GAA GTC CAA AGA AAA CTT GGA

1150 1160 1170
 TTT GCT CTT TCT GAC ATC TCG GTG GTT AGC

1180 1190 1200
 AAT TAT TCC TCT GAG TGG GAG CTG GAC CCT

1210 1220 1230
 GTA AAG GAT GTT CTA ATT CTT TCT GCT CTG

1240 1250 1260
 AGA CGA ATG CTA TGG GCT GCA GAT GAC TTC

1270 1280 1290
 TTA GAG GAT TTG CCT TTT GAG CAA ATA GGG

1300 1310 1320
 AAT CTA AGG GAG GAA ATT ATC AAC TGT GCA

1330
 CAA GGA AAA AAA 3'
 5'

図 - 2

AAAAATTTATTCGCTTCAAGAAAATTTCTGT
TTTTTAAATAAACGAAAGTCCTTTAAAAAGACA

ATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTC
TATTACACACCTAACACTCGCCTATTGTTAAAG

図-3(4の1)

250 260 270 280 290 300
 CTA GGA CTA TAT ACA CCA GAA ACA CTG TTT TGT TGT GAC GTT GCA AAA TAT AAC TCC CCA
 Leu Gly Leu Tyr Thr Pro Glu Thr Leu Phe Cys Cys Asp Val Ala Lys Tyr Asn Ser Pro

 310 320 330 340 350 360
 ACT AAT TTC CAG ATA GAT GGA AGA AAT AGA AAA GTG ATT ATG GAC TTA AAG ACA ATG GAA
 Thr Asn Phe Gin Ile Asp Gly Arg Asn Arg Lys Val Ile Met Asp Leu Lys Thr Met Glu

 370 380 390 400 410 420
 AAT CTT GGA CTT GCT CAA AAT TGT ACT ATC TCT ATT CAG GAT TAT GAA GTT TTT CGA TGC
 Asn Leu Gly Leu Ala Gin Asn Cys Thr Ile Ser Ile Gin Asp Tyr Glu Val Phe Arg Cys

 430 440 450 460 470 480
 GAA GAT TCA CTG GAC GAA AGA AAG ATA AAA GGG GTC ATT GAG CTC AGG AAG AGC TTA CTG
 Glu Asp Ser Leu Asp Glu Arg Lys Ile Lys Gly Val Ile Glu Leu Arg Lys Ser Leu Leu

 490 500 510 520 530 540
 TCT GCC TTG AGA ACT TAT GAA CCA TAT GGA TCC CTG GTT CAA CAA ATA CGA ATT CTG CTG
 Ser Ala Leu Arg Thr Tyr Glu Pro Tyr Gly Ser Leu Val Gin Gin Ile Arg Ile Leu Leu

 550 560 570 580 590 600
 CTG GGT CCA ATT GGA GCT GGG AAG TCT AGC TTT TTC AAC TCA GTG AGG TCT GTT TTC CAA
 Leu Gly Pro Ile Gly Ala Gly Lys Ser Ser Phe Phe Asn Ser Val Arg Ser Val Phe Gin

 610 620 630 640 650 660
 GGG CAT GTA ACG CAT CAG GCT TTG GTG GGC ACT AAT ACA ACT GGG ATA TCT GAG AAG TAT
 Gly His Val Thr His Gin Ala Leu Val Gly Thr Asn Thr Thr Gly Ile Ser Glu Lys Tyr

図-3 (つづ)

670	680	690	700	710	720
AGG ACA TAC TCT ATT AGA GAC GGG AAA GAT GGC AAA TAC CTG CCA TTT ATT CTG TGT GAC					
Arg Thr Tyr Ser Ile Arg Asp Gly Lys Asp Gly Lys Tyr Leu Pro Phe Ile Leu Cys Asp					
730	740	750	760	770	780
TCA CTG GGG CTG AGT GAG AAA GAA GGC GGC CTG TGC ATG GAT GAC ATA TCC TAC ATC TTG					
Ser Leu Gly Leu Ser Glu Lys Glu Gly Leu Cys Met Asp Asp Ile Ser Tyr Ile Leu					
790	800	810	820	830	840
AAC GGT AAC ATT CGT GAT AGA TAC CAG TTT AAT CCC ATG GAA TCA ATC AAA TTA AAT CAT					
Asn Gly Asn Ile Arg Asp Arg Tyr Gin Phe Asn Pro Met Glu Ser Ile Lys Leu Asn His					
850	860	870	880	890	900
CAT GAC TAC ATT GAT TCC CCA TCG CTG AAG GAC AGA ATT CAT TGT GTG GCA TTT GTA TTT					
His Asp Tyr Ile Asp Ser Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile His Cys Val Ala Phe Val Phe					
910	920	930	940	950	960
GAT GCC AGC TCT ATT GAA TAC TTC TCC TCT CAG ATG ATA GTA AAG ATC AAA AGA ATT CGA					
Asp Ala Ser Ser Ile Glu Tyr Phe Ser Ser Gin Met Ile Val Lys Ile Lys Arg Ile Arg					
970	980	990	1000	1010	1020
AGG GAG TTG GTA AAC GCT GGT GTG GTA CAT GTG GCT TTG CTC ACT CAT GTG GAT AGC ATG					
Arg Glu Leu Val Asn Ala Gly Val Val His Val Ala Leu Leu Thr His Val Asp Ser Met					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GAT CTG ATT ACA AAA GGT GAC CTT ATA GAA ATA GAG AGA TGT GTG CCT GTG AGG TCC AAG					
Asp Leu Ile Thr Lys Gly Asp Leu Ile Glu Ile Glu Arg Cys Val Pro Val Arg Ser Lys					

図 -3 (その3)

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CTA GAG GAA GTC CAA AGA AAA CTT GGA TTT GCT CTT TCT GAC ATC TCG GTG GTT AGC AAT
Leu Glu Glu Val Gln Arg Lys Leu Gly Phe Ala Leu Ser Asp Ile Ser Val Val Ser Asn

1150 1160 1170 1180 1190 1200
TAT TCC TCT GAG TGG GAG CTG GAC CCT GTA AAG GAT GTT CTA ATT CTT TCT GCT CTG AGA
Tyr Ser Ser Glu Trp Glu Leu Asp Pro Val Lys Asp Val Leu Ile Leu Ser Ala Leu Arg

1210 1220 1230 1240 1250 1260
CGA ATG CTA TGG GCT GCA GAT GAC TTC TTA GAG GAT TTG CCT TTT GAG CAA ATA GGG AAT
Arg Met Leu Trp Ala Ala Asp Asp Phe Leu Glu Asp Leu Pro Phe Glu Gin Ile Gly Asn

1270 1280 1290 1300
CTA AGG GAG GAA ATT ATC AAC TGT GCA CAA GGA AAA AAA TAG
Leu Arg Glu Glu Ile Ile Asn Cys Ala Gin Gly Lys Lys ***

図-4 (e01)

10	20	30	40	50	60	70	80	
5'	GGGGGGCTAC	CCTCAGCTCT	AGCTCATACT	ACAGACAGTA	CAACAGATCA	AGAAGTATGG	CAGTGACAAC	TCGTTTGACA
3'	CCCCCCGATG	GGAGTCGAGA	TCGAGTATGA	TGTCTGTCA	GTTGTCTAGT	TCTTCATACC	GTCACTGTTG	AGCAAACGTG
90	100	110	120	130	140	150	160	
TGGTTGCATG	AAAAGATCCT	GCAAAATCAT	TTTGGAGGGA	AGCGGCTTAG	CCTTCTCTAT	AAGGGTAGTG	TCCATGGATT	
ACCAACGTAC	TTTTCTAGGA	CGTTTTAGTA	AAACCTCCCT	TCGCCGAATC	GGAAGAGATA	TTCCCACAC	AGGTACCTAA	
170	180	190	200	210	220	230	240	
CCATAATGGA	GTTTGCTTG	ACAGATGTTG	TAATCAAGGG	CCTACTCTAA	CAGTGATTAA	TAGTGAAGAT	CATATTATTG	
GGTATTACCT	CAAAACGAAC	TGTCTACAAAC	ATTAGTTCCC	GGATGAGATT	GTCACTAAAT	ATCACTTCTA	GTATAATAAC	
250	260	270	280	290	300	310	320	
GAGCATATGC	AGAAGAGGGT	TACCAAGAAA	GAAAGTATGC	TTCCATCATC	CTTTTGAC	TTCAAGAGAC	AAAAATTCA	
CTCGTATACG	TCTTCTCCCA	ATGGTCCTT	CTTTCATACG	AAGGTAGTAG	GAAAAACGTG	AAGTTCTCTG	ATTTAAAGT	
330	340	350	360	370	380	390	400	
GAATGGAAAC	TAGGACTATA	TACACCAGAA	ACACTGTTT	GTTGTGACGT	TGCAAAATAT	AACTCCCCAA	CTAATTCCA	
CTTACCTTG	ATCCTGATAT	ATGTGGTCTT	TGTGACAAAA	CAACACTGCA	ACGTTTTATA	TTGAGGGTT	GATTAAAGT	
410	420	430	440	450	460	470	480	
GATAGATGGA	AGAAATAGAA	AAGTGATTAT	GGACTTAAAG	ACAATGGAAA	ATCTGGACT	TGCTAAAAT	TGTACTATCT	
CTATCTACCT	TCTTATCTT	TTCACTAATA	CCTGAATTTC	TGTTACCTTT	TAGAACCTGA	ACGAGTTTA	ACATGATAGA	
490	500	510	520	530	540	550	560	
CTATTCAGGA	TTATGAAGTT	TTTCGATGCG	AAGATTCACT	GGACGAAAGA	AAGATAAAAG	GGGTCATTGA	GCTCAGGAAG	
GATAAGTCCT	AATACTTCAA	AAAGCTACGC	TTCTAAGTGA	CCTGCTTTCT	TTCTATTTTC	CCCAGTAAC	CGAGTCCTTC	
570	580	590	600	610	620	630	640	
AGCTTACTGT	CTGCCTTGAG	AACTTATGAA	CCATATGGAT	CCCTGGTTCA	ACAAATACGA	ATTCTGCTGC	TGGGTCCAAT	
TCGAATGACA	GACGGAAC	TTGAATACTT	GGTATACCTA	GGGACCAAGT	TGTTTATGCT	TAAGACGACG	ACCCAGGTTA	

図-4 (つ02)

650 660 670 680 690 700 710 720
 TGGAGCTGGG AAGTCTAGCT TTTTCAACTC AGTGAGGTCT GTTTCCAAG GGCATGTAAC GCATCAGGCT TTGGTGGCA
 ACCTCGACCC TTCAGATCGA AAAAGTTGAG TCACTCCAGA CAAAAGGTTG CCGTACATTG CGTAGTCCGA AACCAACCGT

 730 740 750 760 770 780 790 800
 CTAATAACAAC TGGGATATCT GAGAAGTATA GGACATACTC TATTAGAGAC GGGAAAGATG GCAAATACCT GCCATTATT
 GATTATGTTG ACCCTATAGA CTCTTCATAT CCTGTATGAG ATAATCTCTG CCCTTCTAC CGTTTATGGA CGGTAAATAA

 810 820 830 840 850 860 870 880
 CTGTGTGACT CACTGGGGCT GAGTGAGAAA GAAGGCGGCC TGTCATGGA TGACATATCC TACATCTTGA ACGGTAACAT
 GACACACTGA GTGACCCCCGA CTCACTCTT CTTCCGCCGG ACACGTACCT ACTGTATAGG ATGTAGAACT TGCCATTGTA

 890 900 910 920 930 940 950 960
 TCGTGATAGA TACCAAGTTA ATCCCATGGA ATCAATCAA TTAAATCATC ATGACTACAT TGATTCCCCA TCGCTGAAGG
 AGCACTATCT ATGGTCAAAT TAGGGTACCT TAGTTAGTTT AATTAGTAG TACTGATGTA ACTAAGGGGT AGCGACTTCC

 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 ACAGAATTCA TTGTGTGGCA TTTGTATTTG ATGCCAGCTC TATTGAATAC TTCTCTCTC AGATGATAGT AAAGATCAA
 TGTCTTAAGT AACACACCGT AAACATAAAC TACGGTCGAG ATAACCTATG AAGAGGGAGAG TCTACTATCA TTTCTAGTTT

 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 AGAATTCGAA GGGAGTTGGT AAACGCTGGT GTGGTACATG TGGCTTGCT CACTCATGTG GATAGCATGG ATCTGATTAC
 TCTTAAGCTT CCCTCAACCA TTTGCACCA CACCATGTAC ACCGAAACGA GTGAGTACAC CTATCGTACC TAGACTAATG

 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AAAAGGTGAC CTTATAGAAA TAGAGAGATG TGTGCCTGTG AGGTCCAAGC TAGAGGAAGT CCAAAGAAAA CTTGGATTG
 TTTTCCACTG GAATATCTT ATCTCTCTAC ACACGGACAC TCCAGGTTCG ATCTCCTTCA GGTTTCTTT GAACCTAAAC

 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 CTCTTCTGA CATCTCGGTG GTTAGCAATT ATTCTCTGA GTGGGAGCTG GACCCGTAA AGGATGTTCT AATTCTTTCT
 GAGAAAGACT GTAGAGCCAC CAATCGTTAA TAAGGAGACT CACCCCTCGAC CTGGGACATT TCCTACAAGA TTAAGAAAGA

図-4 (その3)

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
GCTCTGAGAC GAATGCTATG GGCTGCAGAT GACTTCTTAG AGGATTGCC TTTTGAGCAA ATAGGGAAATC TAAGGGAGGA
CGAGACTCTG CTTACGATAAC CCGACGTCTA CTGAAGAACATC TCCTAACCGG AAAACTCGTT TATCCCTTAG ATTCCCTCCT
1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
AATTATCAAC TGTGCACAAG GAAAAAAAATA GATATGTGAA AGGTTCACGT AAATTCCTC ACATCACAGA AGATTAATAAT
TTAATAGTTG ACACGTGTTG CTTTTTTAT CTATACACTT TCCAAGTGCA TTTAAAGGAG TGAGTGTCT TCTAATTTA
1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
TCAGAAAGGA GAAAACACAG ACCAAAGAGA AGTAACATAAG ACCAAAGGGA TGTGTTTAT TAATGTCTAG GATGAAGAAA
AGTCTTCCT CTTTGTGTC TGGTTCTCT TCATTGATTG TGGTTCCCT ACACAAAATA ATTACAGATC CTACTTCTT
1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
TGCATAGAAC ATTGTAGTAC TTGTAAATAA CTAGAAATAA CATGATTTAG TCATAATTGT GAAAAATAAT AATAATTTT
ACGTATCTTG TAACATCATG AACATTATT GATCTTATT GTACTAAATC AGTATTAACA CTTTTTATTA TTATTAAGAAA
1610 1620 1630 1640 1650 1660
CTTGGATTTA TGTTCTGTAT CTGTAAAAA ATAAATTCT TATAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAA 3'
GAACCTAAAT ACAAGACATA GACACTTTT TATTTAAAGA ATATTTTTT TTTTTTTT TTTTTTT 5'

図 - 5

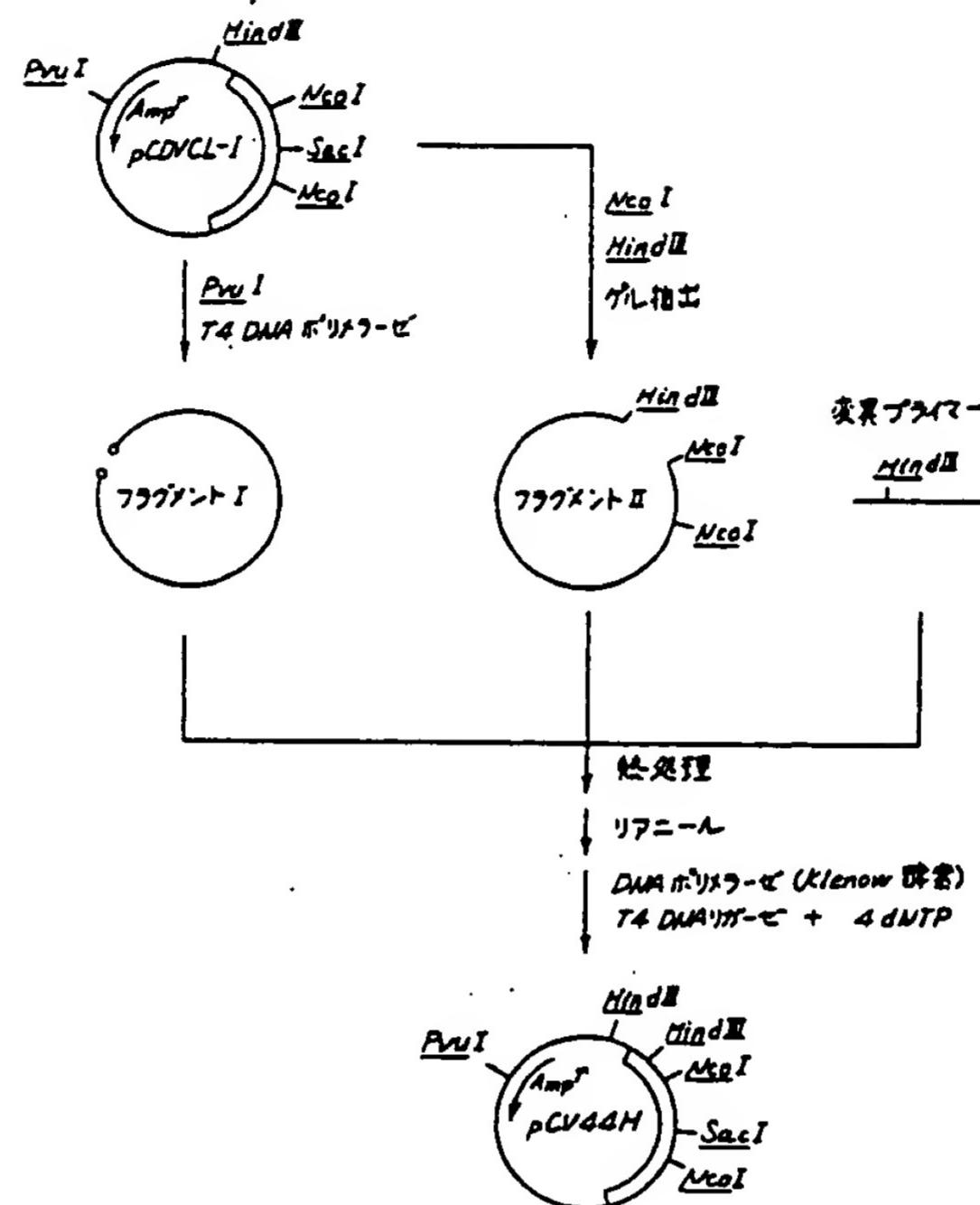


図 - 6

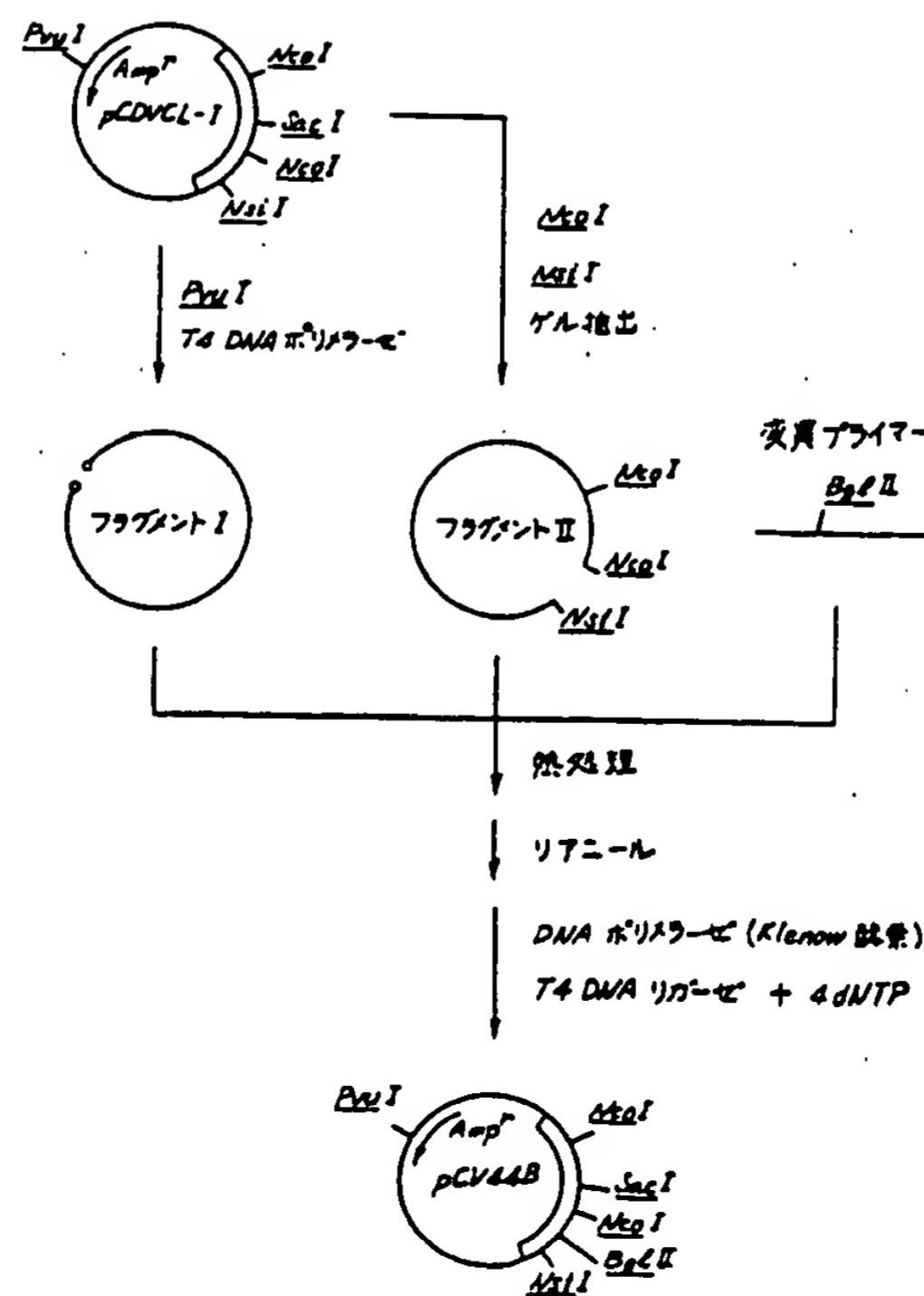
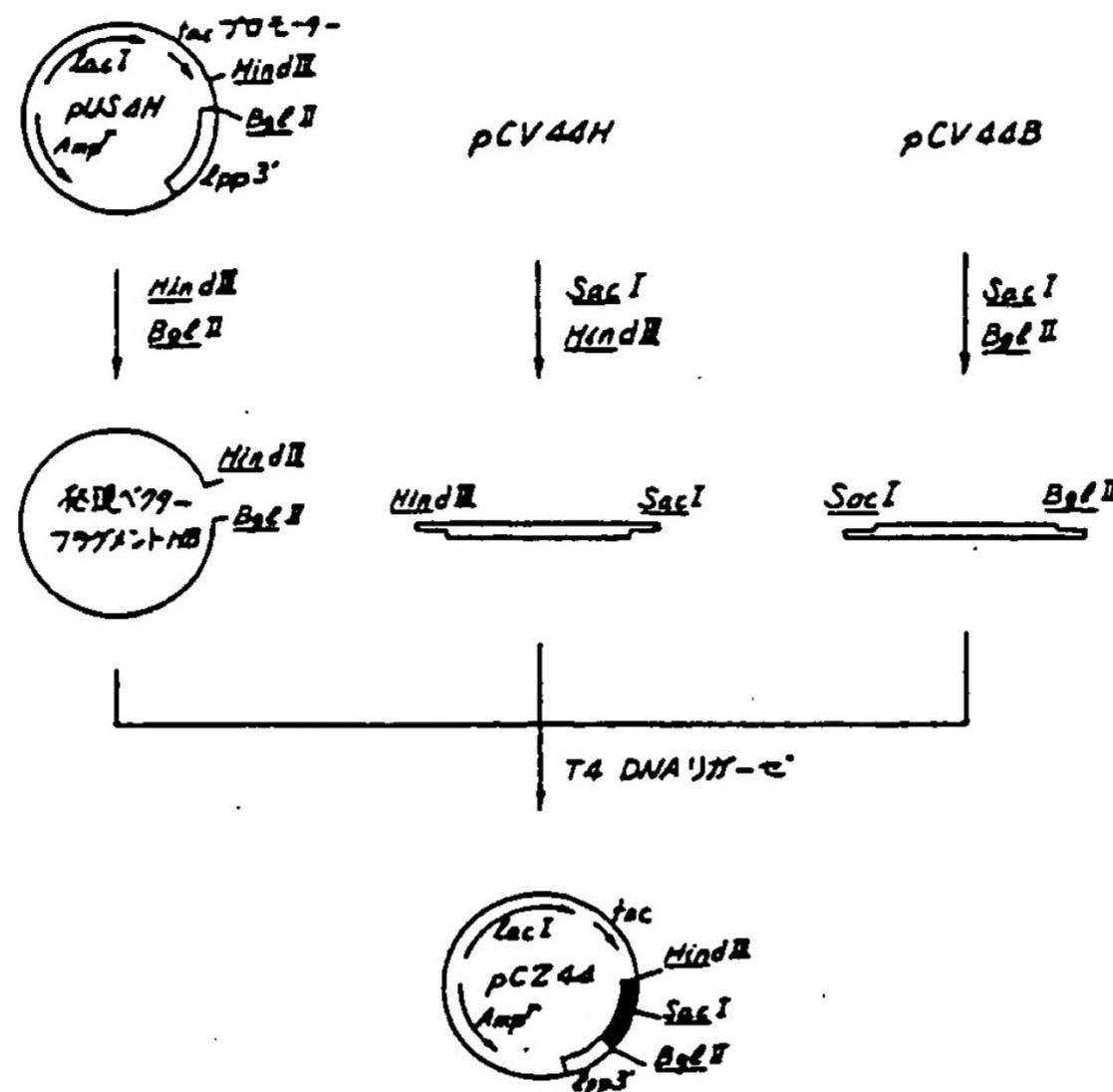


図 - 7



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 1	識別記号	厅内整理番号
C 12 P 21/02		C-6712-4B
//(C 12 P 21/02 C 12 R 1:19)		
⑥発明者 寺 西 豊	神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内	
⑥発明者 高 橋 和 展	神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内	
⑥発明者 中 西 重 忠	京都府京都市左京区岩倉長谷町517-116	
⑥発明者 喜 多 村 直 実	大阪府守口市八雲東町2-272	